

Multilineage-differentiating stress enduring (Muse) 細胞による自己免疫性心筋炎モデルラット に対する細胞治療効果の検討

著者	鷹谷 紘樹
号	89
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	医博第4036号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00129473

氏 名	鷹谷 紘樹
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学位授与年月日	2020 年 3 月 25 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 医科学専攻
学位論文題目	Multilineage-differentiating stress enduring (Muse) 細胞による自己免疫性心筋炎モデルラットに対する細胞治療効果の検討
論文審査委員	主査 教授 齋木 佳克 教授 加賀谷 豊 教授 後藤 昌史

論 文 内 容 要 旨

背景：心筋炎は種々の病因により引き起こされる心筋を主座とした炎症性疾患であり、重症化した場合、激しい心筋破壊が生じる。抗炎症薬による治療や免疫抑制療法等の対症療法が試みられているが、未だエビデンスは確立されていない。これまでの間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell: MSC) を用いた研究では、paracrine 効果による心機能改善効果が示されているが、心筋再生が得られたとする報告はなく、治療効果も限定的である。Multilineage-differentiating stress enduring (Muse) 細胞はヒト内在性の多能性幹細胞であり、静脈投与により障害組織に遊走し、自発的に組織特異的な細胞へと分化することで組織修復がもたらされることが報告されている。今回、ラット心筋炎モデルに対する Muse 細胞の治療効果を検討し、奏功機序を解明することを目的とした。

方法：ブタ由来ミオシンをラットに皮下注射し自己免疫性心筋炎モデルを作製した。ヒト骨髄由来 MSC を用いて、多能性マーカーである stage-specific embryonic antigen-3 により MSC 中の Muse 細胞を標識し、magnetic-activated cell sorting により Muse 細胞を分離した。心筋炎が最も重症化する心筋炎誘導後 3 週目に、Muse 細胞 200,000 細胞、MSC 200,000 細胞、MSC 3,000,000 細胞 (Muse 200,000 細胞と同等の SSEA-3 陽性細胞を含む) または vehicle (生理食塩水) を静脈投与した。心筋炎誘導後 3 週目に加えて 4 週目にも Muse 細胞 200,000 細胞ずつ投与する群も設けた。また、投与された Muse 細胞の生体内分布および分化能を評価する目的で Nano-lantern または green fluorescent protein を導入した Muse 細胞を fluorescent-activated cell sorting により分離し、それぞれ in vivo imaging system (IVIS) または蛍光免疫染色を行った。いずれにおいても免疫抑制剤は使用しなかった。細胞投与後 2 週目および 8 週目に magnetic resonance imaging による心機能評価を行った。組織学的評価は細胞投与 3 日目に TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 染色によるアポトーシスを起こした細胞数、2 週目に透明化した心筋炎組織内の血管内容積、および 8 週目に Masson-Trichrome 染色による線維化面積を各群間で比較検討した。

結果：細胞投与後 2 週目において、投与された Muse 細胞は障害組織である心臓へ遊走・生着し、心筋細胞および血管構成細胞への分化した。また、Muse 細胞は心臓のみに集積し、他臓器には認めなかった。左室駆出率は Muse 細胞単回投与群で $73.1 \pm 1.9\%$ であり、MSC 200,000 細胞群 ($66.7 \pm 2.4\%$, $p < 0.001$)、MSC 3,000,000 細胞群 ($68.3 \pm 2.3\%$, $p < 0.01$)、Vehicle 群 ($60.8 \pm 2.4\%$, $p < 0.001$) に比べて有意に高かった。Muse 細胞単回投与群は Muse 細胞複数回投与群 ($73.2 \pm 2.0\%$) と同等の心機能改善効果を認めた。3 日目の組織評価では、Muse 細胞単回投与群で TUNEL 陽性細胞の有意な減少を認めた (TUNEL 陽性細胞数、Muse 細胞単回投与群 1.8 ± 0.4 細胞/mm²; Vehicle 群 7.0 ± 1.6 細胞/mm², $p < 0.05$; MSC 200,000 細胞群 3.6 ± 0.4 細胞/mm²; MSC 3,000,000 細胞群 4.4 ± 0.9 細胞/mm²)。2 週目の血管新生評価では、Muse 細胞単回投与群で有意な血管容積の増大を

(書式 1 2)

認めた (%血管内容積/心臓組織体積, Muse 細胞単回投与群 $7.4 \pm 1.2\%$; Vehicle 群 $3.2 \pm 0.5\%$, $p < 0.05$; MSC 200,000 細胞群 $5.5 \pm 0.3\%$). 8 週目の組織評価では, Muse 細胞単回投与群で線維化面積の有意な減少を認めた (%心臓線維面積/心臓断面積, Muse 単回投与群 $6.0 \pm 2.0\%$; Muse 複数回投与群 $4.8 \pm 3.4\%$; Vehicle 群 $12.1 \pm 4.5\%$, $p < 0.05$; MSC 200,000 細胞群 $8.6 \pm 2.6\%$; MSC 3,000,000 細胞群 $8.5 \pm 4.5\%$).

結論: 心筋炎モデルラットに対する Muse 細胞の静脈投与により, Muse 細胞は障害心筋組織へ遊走し, 心筋細胞および血管構成細胞へ自発的に分化した. さらに, Muse 細胞による抗アポトーシス効果, 抗線維化作用, 血管新生の複合的な効果により MSC を上回る心機能改善効果が得られた. Muse 細胞は非障害臓器への遊走・生着も極めて少ないことなど, 安全性の面からも心筋炎に対する細胞治療の細胞源として有望であることが示唆された.

審 査 結 果 の 要 旨

博士論文題目 Multilineage differentiating stress enduring (Muse) 細胞による

自己免疫性心筋炎モデルラットに対する細胞治療効果の検討

所属専攻・分野名 医科学 専攻・ 心臓血管外科学 分野

学籍番号 B6MD5082 氏名 鷹谷 紘樹

本学位論文は、ラット自己免疫性心筋炎モデルに対する Muse 細胞投与による治療効果および奏功機序の解明と、Muse 細胞の心筋炎治療における臨床的適用性を評価することを目的とした論文である。

心筋炎に対する積極的治療法は未だ確立されていないと言わざるを得ない。これまでに間葉系幹細胞を用いた実験的研究が報告されているが、主に投与細胞による paracrine 効果や抗炎症効果による組織の保持が主な治療機序とされており、投与細胞の心筋細胞への分化効率は限定的なものに留まる。また、過去の心筋炎に対する研究はいずれも心筋炎導入直後、すなわち心機能低下が顕在化する前から治療を開始しており、実臨床に即した実験プロトコールとは言えない。

本研究では、ヒト生体内に内在する新たな多能性幹細胞として報告された Muse 細胞に着目し、心筋炎が最も重症化するタイミングで Muse 細胞を静脈投与することにより、心機能の改善が得られている。その奏功機序として、Muse 細胞のスフィンゴシン-1 リン酸を介した障害組織への遊走能、心筋細胞および血管構成細胞への自発分化能が明らかにされている。さらに、投与された異種 Muse 細胞は一定期間 stressful な炎症組織においても生着・生存が維持されることが確認されている。Muse 細胞による抗アポトーシス効果、血管新生効果、抗線維化効果も認め、これらの複合的な効果により心筋組織の保持・修復が得られ、左室機能の改善に寄与したことが示唆されたとしている。慢性期には投与された Muse 細胞は心筋組織から脱落し、かつ細胞治療後早期と比較して心機能改善効果が減弱していることを受け、異種細胞移植による免疫拒絶反応が原因と考察し今後の研究課題としている。

Muse 細胞が元来非腫瘍性の細胞であることに加え、Muse 細胞は障害組織のみに遊走・生着したこと、細胞投与による明らかな有害事象を認めなかったことにより、一定の安全性が示された。さらに、培養・濃縮して得られた Muse 細胞を用いて、免疫抑制剤や細胞に対する事前の処置を行わずに静脈投与を行うという簡便かつ実臨床に即した治療プロトコールで心機能改善効果が示された。

以上より、本研究では未だ根本的治療法の確立されていない心筋炎に対する新たな積極的治療法として、Muse 細胞治療の有効性が示された。さらに Muse 細胞治療の安全性についても検討を加えることで臨床的適用性について一定の評価を下した研究と言える。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。